动 物 学 研 究 2007, Oct. 28(5): 485－490 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

星形胶质细胞存在 L-型钙通道的新证据

王 磊[1,2]，蔡景霞[1,*]

（1. 中国科学院昆明动物研究所 脑与行为实验室，云南 昆明 650223；2. 中国科学院研究生院，北京 100049）

摘要：以纯化培养的小鼠星形胶质细胞(Astrocyte，AS)为实验材料，采用激光共聚焦钙成像和荧光分光光度计技术，探讨钙激动剂 Bay k8644 和钙拮抗剂 nimodipine 对星形胶质细胞胞内钙离子浓度的影响。结果显示，Bay k8644 在 0.0001、0.001 和 0.01 mmol/L 浓度下均可显著增加星形胶质细胞的细胞内钙水平，而 nimodipine 在 0.001、0.01 和 0.1 mmol/L 浓度下均可显著降低星形胶质细胞胞内钙水平，并阻止 KCl 引起的细胞内钙升高。上述结果表明星形胶质细胞对 L-型钙通道激动剂和拮抗剂的反应与神经元的反应相似，提示星形胶质细胞胞膜上也存在 L-型钙通道。

关键词: 星形胶质细胞；细胞内钙浓度；Nimodipine；Bay k8644；L-型钙通道
中图分类号：Q25; Q421 **文献标识码：**A **文章编号：**0254-5853-(2007)05-0485-06

New Proof for Astrocytes Having L-type Calcium Channels

WANG Lei[1,2], CAI Jing-xia[1,*]

(1.*Divison of Brain and Behavior, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences , Kunming* 650223, *China;*
2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, *China*)

Abstract: The laser scanning confocal microscope and fluorescence spectrophotometer were used to investigate the effects of the L-type calcium channel agonist 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-5-nitro-4-[2-(trifluoromethyl)phenyl] pyridine-3-carboxylic acid [(±)-Bay k8644] and antagonist nimodipine on intra-cellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) of cultured mouse astrocyetes. The results showed that Bay K8644 can significantly increase the $[Ca^{2+}]_i$ in cultured astrocytes at doses of 0.0001, 0.001 and 0.01 mmol/L, whereas nimodipine can decrease the $[Ca^{2+}]_i$ at doses of 0.001, 0.01 and 0.1 mmol/L. Nimodipine can also decrease the elevation of $[Ca^{2+}]_i$ elicited by KCl. Our results suggest that the effects of L-type calcium channel agonist and antagonist on astrocyes are the same as those on neurons, it indicates that astrocytes also have L-type calcium channels.

Key words: Astrocyte; Intra-cellular calcium concentration($[Ca^{2+}]_i$); Nimodipine; Bay k8644; L-type calcium channel

星形胶质细胞是中枢神经系统中数目最多的一种胶质细胞。近年来发现，星形胶质细胞除了在中枢神经系统起支持、隔离、营养、清洁和防御的作用外，也参与调节中枢神经系统的发育和脑高级功能。

长期以来，人们普遍认为星形胶质细胞与神经元和胞外环境进行离子交换主要是通过间隙连接（gap junction）完成的。但是近几年，随着膜片钳和钙成像技术的发展，人们发现星形胶质细胞也具有多种离子通道和神经递质受体。在星形胶质细胞对各种理化刺激作出反应的过程中，其胞内钙离子浓度的变化与其功能的变化相一致。

MacVicar et al (1984, 1988)在培养的星形胶质细胞上观察到了钙依赖性的动作电位的发放，之后又在培养的星形胶质细胞上记录到了 nifedipine 敏感的 L-型钙电流。应用经典的钙成像技术，MacVicar 等观察到星形胶质细胞在去极化时胞外钙离子内流，胞内钙离子浓度升高(MacVicar et al, 1991; Jensen & Chiu, 1991)。同时，在脑片上也有人记录到，钾离子可以增加星形胶质细胞的胞内钙离子浓度，这种反应可以被钙通道拮抗剂 verapamil 抑制或者显著降低(Porter & McCarthy, 1995; Duffy

收稿日期：2007-06-19；接受日期：2007-09-11
基金项目：国家科技部高技术研究发展计划（863 计划）（2002AA2Z3115）
*通讯作者（Corresponding author），E-mail: caijx@post.kiz.ac.cn

& MacVicar, 1996)。这些研究结果都表明星形胶质细胞上存在电压门控型钙通道。

Bay k8644和nimodipine是双氢吡啶类化合物（DHPs），已证实均作用于神经元的L-型钙通道。在化学结构上，DHPs类Ca^{2+}激动剂与DHPs类Ca^{2+}拮抗剂相反，在DHP环的3-和5-位不是都有酯类物，这导致了4-位碳原子的不对称性及异构体的存在。DHPs类Ca^{2+}激动剂与拮抗剂的不同作用，就是由不同结构DHPs分子所造成。Fanelli et al (1994)研究发现，nimodipine可以阻断海马神经元L-型钙通道活性，抑制去极化引起的神经元胞内游离钙离子增加。也已证明，Bay k8644为特异性的L-型钙通道激动剂，可以使海马CA1、CA3区的锥体神经元L-型钙通道的开放概率明显增加，并可增加单通道长时程开放比例等(Hirasawa et al, 1998)。

迄至目前，尚未见Bay k8644和nimodipine对星形胶质细胞胞内钙含量影响的报道。本研究采用激光共聚焦和荧光分光光度计技术直接测定Bay k8644和nimodipine对培养的小鼠星形胶质细胞胞内钙浓度的影响，拟提供星形胶质细胞上存在L-型钙通道的新证据。

1 材料和方法

1.1 试 剂

DMEM培养基（高糖），GIBICO公司产品；新生牛血清，杭州四季青公司产品；多聚赖氨酸（Poly-L-Lysine）、胰酶、Bay k8644、Frua-2/AM、Fluo-4/AM、nimodipine和EDTA均为SIGMA公司产品；GFAP免疫组化ABC试剂盒，VECTOR公司产品；DAB显色试剂盒，武汉博士德生物工程有限公司产品。

1.2 仪器设备

LSM510 META倒置激光共聚焦扫描电子显微镜（德国Zeiss公司），PE LS-50B荧光分光光度计（美国Perkin-Elmer公司），CO_2培养箱（美国Shellab公司），Axiovert 200倒置相差显微镜（美国Zeiss公司），SW-CJ-IB超净工作台(中国苏州净化设备厂)。

1.3 实验动物

昆明小鼠种鼠由昆明医学院医学院实验动物中心提供，新生小鼠由本实验室繁殖。

1.4 细胞培养

按照McCarthy & Devllis(1980)的方法进行星形胶质细胞的原代培养。取昆明种小鼠（出生0—3 d）或胎鼠（孕17—20 d），酒精消毒，剪断肋骨，暴露整个心脏，剪开右心耳，用注射器吸取1mL Hank’s液由心尖部经左心室先快后慢地推入灌流直至脑部变白，目的是去除脑部血液以清除血细胞。然后剪开头部皮肤，去除颅骨，用眼科镊夹取两侧大脑皮层，放入盛有冰冷Hank’s的培养皿中，用Hank’s液洗一次，仔细剥去血管和脑膜，再移入3 mL的小烧杯中，用虹膜剪剪碎呈糜状，移入到盛有适量0.125%胰蛋白酶的溶液中，在37℃水浴锅中消化10 min左右，消化至组织块略粘时，用含10％小牛血清的冰冷的DMEM终止消化后换DMEM液，用巴氏管轻轻吹打数次，200目钢网过滤，滤液在1000 r/min下离心5 min，去上清液，以彻底清除胰蛋白酶，最后用DMEM悬浮细胞制成细胞悬液后种植到培养瓶内，用含10%新生牛血清、1% Penicillin和Streptomycin(100 μg/mL)的DMEM培养基，在37℃、95%空气和5%CO_2条件下恒温培养7—9 d，待细胞长满瓶底，用恒温摇床法去除表面的神经元和成纤维细胞层，用胰酶解离贴壁的星形胶质细胞传代培养。经2—3次传代培养后，用免疫组织化学的方法鉴定，胶质原纤维酸性蛋白（glia fibrilary acidic protein，GFAP）单抗染色阳性细胞即为星形胶质细胞。一般传代2次左右即可达到实验要求的95%的纯度(Vernadakis et al, 1994)。

1.5 星形胶质细胞免疫组织化学染色方法

使用GFAP ABC试剂盒进行免疫组化染色。将含有贴壁星形胶质细胞的盖玻片用PBS冲洗，4%多聚甲醛固定20 min后，3%双氧水灭活内源性过氧化物酶20 min，加入0.3%Triton X-100室温孵育20 min，3%马血清中室温孵育30 min，之后滴加单克隆抗GFAP抗体（1∶1000），4℃湿盒孵育过夜，滴加二抗 （1∶200）于37℃孵育1.5 h，滴加三抗（1∶100）于37℃孵育1.5 h；各步之间用PBS冲洗3次，每次5 min，最后用DAB显色5 min，常规脱水、透明和封片。

1.6 激光共聚焦技术测定胞内钙荧光值

将备用的星形胶质细胞以胰酶解离，把细胞悬液调整至密度1×10^5个/mL，种于铺于多聚赖氨酸的无菌塑料培养板中，置于含有95%空气、5%CO_2

和 37℃恒温湿化的培养箱内，进行单层细胞培养。培养 5 天后用 Hanks 液漂洗 2—3 次，洗去细胞表面的杂质，放入含有 2μmol/L Fluo-4/AM 的 DMEM 培养基中，37℃负载 45min，用 Hanks 液洗涤 2—3 次，充分洗去细胞外的 Fluo-4/AM，上机检测。激光共聚焦扫描显微镜检测设置：荧光探针 Fluo-4/AM 的激发波长 494nm，发射波长 516nm，扫描间隔为 10s(Burnier et al, 1994; Liu et al, 2002)。先扫描静息状态下的星形胶质细胞 60s，然后加入各浓度的 nimodipine 或 Bay k8644，在同一视野下继续扫描，观察胞浆内钙荧光的动态变化。图像分析处理软件为 ZEISS image examiner。

1.7　荧光分光光度计测定胞内钙浓度

将备用的星形胶质细胞培养瓶中 DMEM 培养基倒出后，用 Hanks 液冲洗，去除 DMEM 培养基中残留的血清，以利于胰酶的消化。在瓶中加入 0.25%胰酶+0.02%EDTA 消化液 2—3mL，37℃孵育 3—5min，至瓶内底层星形胶质细胞成球形后，将胰酶混合液倒出，以含 10%新生牛血清的 DMEM 培养基轻轻冲洗以去掉胰酶，终止消化。加入适量 DMEM 培养基用巴氏管轻轻吹打，将底层的星形胶质细胞吹散制成悬液状，200 目钢网过滤，1 000 r/min 离心 5min，去上清液，以彻底清除胰酶混合物，最后用 DMEM 重新悬浮细胞制成细胞悬液。将制备的细胞悬液密度调整至 5×10^4—10×10^4 个/mL，在 37℃下预温 5min 后，加入 0.5mmol/L 的 Fura-2/AM，使其终浓度为 5 mol/L，于 37℃水浴中孵育 45min，离心，用 Hank’s 液洗两次，最后用 Hank’s 液悬浮细胞，并将细胞密度调整为 1×10^5 个/mL 左右。测定前细胞预先于 37℃复温 3min。取 2 mL 细胞悬液于石英比色杯中，用 PE LS-50B 荧光分光光度计测定，激发光栅 10nm，发射光栅 10nm，发射光波长 500nm。先在 300—400nm 扫描，确定最大激发波长在 340nm 处后，用 340/380nm 双波长交替测定荧光比值，待稳定后，先测定细胞静息期的荧光强度，溶剂对照组加 10μL DMSO，实验组加入 Bay k8644 或 nimodipine 作用 5 min 后的荧光强度，然后再加入 0.1% Triton-X-100 测定最大荧光（*R*max）和 10mmol/L EGTA 测定最小荧光（*R*min），按公式计算细胞内游离钙浓度。计算细胞内钙离子浓度的公式为：

$$[Ca^{2+}]_i=Kd\times[(R-R\min)/(R\max-R)]\times(Fa2/Fb2)$$

其中 Kd 为 Fura-2-Ca^{2+}的解离常数，37℃时为 224 nmol/L，Fa2 和 Fb2 分别为零钙和饱和钙条件下 380 nm 激发光产生的荧光强度，*R* 为需测定的 340/380 nm 荧光比值，*R*max 和 *R*min 分别为饱和钙和零钙时 340/380nm 激发光产生的荧光比值，Ca^{2+}浓度的单位为 nmol/L(Wu & Zhang, 1998)。此外，部分 nimodipine 组细胞悬液在加入 Triton-X-100 和 EGTA 前先加入 40 mmol/L 的 KCl，以观察 nimodpine 对钙激动剂的拮抗作用。

1.8　测试试剂浓度

加入的 nimodipine 终浓度分别为 0.1、0.01 和 0.001 mmol/L，Bay-k8644 终浓度分别为 0.01、0.001 和 0.0001 mmol/L。

1.9　结果分析

统计方法采用双尾 *t* 检验，*$P<0.05$ 为具有显著性差异。

2　结　果

2.1　免疫组织化学鉴定结果

培养的小鼠星形胶质细胞经过传代纯化后，以 GFAP 试剂盒进行免疫组化染色，发现 GFAP 染色阳性细胞达 95%以上。图 1 为染色后的星形胶质细胞图片。图中染成棕黄色的细胞即为星形胶质细胞。

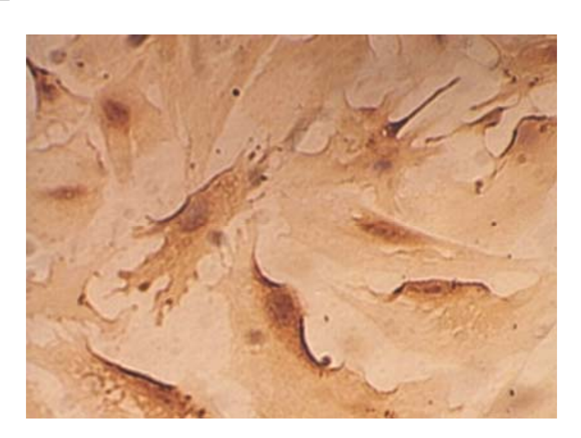


图 1　免疫组化方法检测纯化的小鼠星形胶质细胞上 GFAP 的表达(相差显微镜图，× 250)

Fig.1　The expression of GFAP in mouse astrocytes purified culture using the Immuno-histochemistry staining method（Contrast microscope, × 250）

2.2 激光共聚焦测定结果

Bay k8644 在 0.0001、0.001 和 0.01mmol/L 浓度下均可增加培养的小鼠星形胶质细胞胞内钙荧光强度，并呈剂量依赖性（图 2 A)。图 3 A 示加入 Bay k8644 0.001mmol/L 后，各时间点的星形胶质细胞胞内钙荧光强度动态变化图片，实际上加入 Bay k8644（0.001 mmol/L）10 s 后，即可以观察到同一视野内星形胶质细胞钙荧光强度明显增强。加入 Bay k8644 后 20s，胞内钙浓度达到峰值，50s 时，胞内钙荧光值下降，但仍显著高于溶剂对照组，加入后 80s 时，0.001 和 0.01mmol/L 组的胞内钙荧光值恢复到溶剂对照组水平。加入 Bay k8644 0.01 mmol/L 后，在细胞外可发现荧光颗粒，可能是胞内钙超载导致细胞破膜，钙离子外流所致。

Nimodipine 在 0.001、0.01 和 0.1 mmol/L 浓度下降低钙荧光强度，并且呈剂量依赖性（图 2 B)。图 3 B 示加入 nimodipine 后，星形胶质细胞胞内钙荧光强度的动态变化照片。加入各浓度 nimodipine

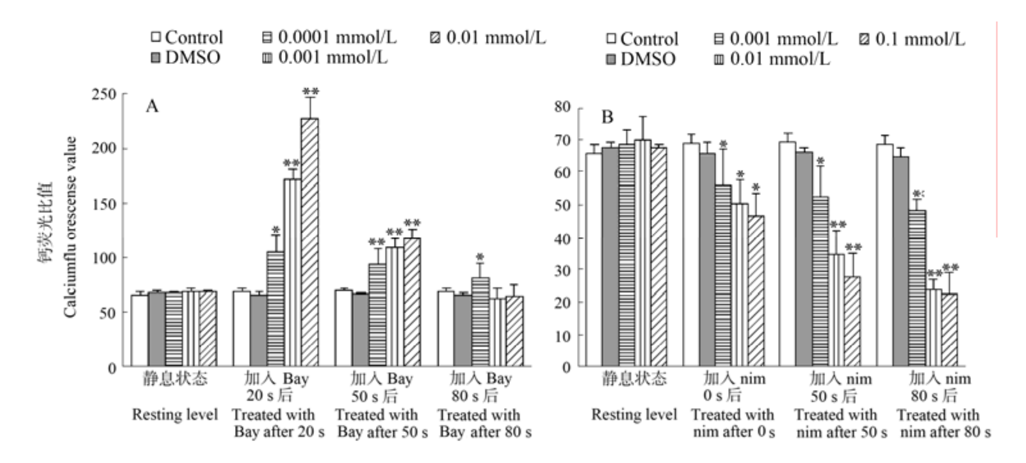


图 2 钙激动剂 Bay k8644(A)和钙拮抗剂 nimodipine(B)对培养的小鼠星形胶质细胞内钙的荧光值的影响

Fig.2 The effects of Bay k844 (A) and nimodipine (B) on the calcium fluorescence intensity of cultured mouse astrocytes

结果表示为平均值±标准差（The results were expressed as mean±*SD*）. $n \geq 6$，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001 *vs*. control.

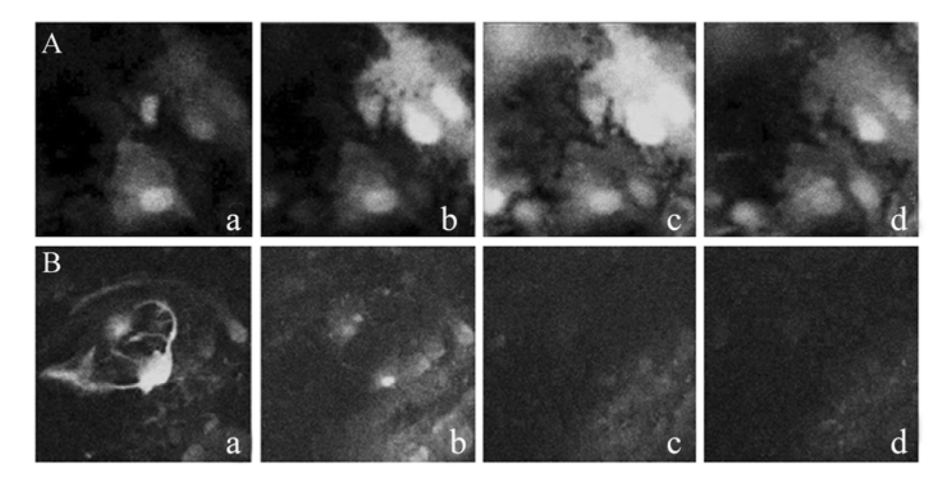


图 3 激光共聚焦扫描显微镜连续扫描的培养的小鼠星形胶质细胞加入 Bay k8644（A）和 nimodipine（B）前后的胞内钙荧光动态变化

Fig. 3 Confocal micrographs showing the dynamic change of the calcium fluorescence intensity of cultured mouse astrocytes treated with Bay k8644（A）and nimodipine（B）

Aa: 加入 Bay k8644 前的静息状态下（in the resting status)；Ab： 0.001mmol/L after 20 s；Ac： 0.001mmol/L after 50 s；Ad： 0.001mmol/L after 80 s.

Ba：加入 nimodipine 前的静息状态下（in the resting status)；Bb： 0.001mmol/L after 20s；Bc： 0.001 mmol/L after 50 s；Bd： 0.001mmol/L after 80 s.

20 s 后，钙荧光值明显降低，作用 60 s 后荧光值降至最低，直至扫描结束仍未恢复基线水平。

空白对照组和溶剂对照组的胞内钙荧光强度在扫描过程中均无显著变化，两组之间也无显著差异。

2.3　荧光分光光度计测定结果

Bay k8644 在 0.0001、0.001 和 0.01 mmol/L 浓度显著增加星形胶质细胞胞内游离钙浓度（图 4 A）。Nimodipine 在 0.01 mmol/L 浓度显著降低星形胶质细胞内游离钙，在 0.1mmol/L 浓度时，因为药物本身黄色的严重干扰，此数据未列入（图 4 B）。0.001 和 0.01 mmol/L 的 nimodipine 可降低 40 mmol/L KCl 产生的升钙作用（图 5）。

空白对照组和溶剂对照组的胞内钙浓度两组之间无显著差异。

3　讨　论

由本研究中激光共聚焦钙成像和荧光分光光度计测定小鼠星形胶质细胞内钙浓度的实验结果表明，星形胶质细胞空白对照组和溶剂对照组之间，在钙成像荧光扫描的各时间点，其钙荧光值均无显著改变。说明实验中培养的星形胶质细胞的活性保持良好，本实验中 DMSO 溶剂在 0.5%浓度下对细胞的活性和胞内钙离子浓度没有影响。

已有报道（Yamamoto et al，1984），DHPs 类激动剂 Bay k8644 可与 L-型 Ca^{2+}通道上的双氢吡啶受体结合，促进 Ca^{2+}的内流。电生理学研究亦证实，所有已知 Ca^{2+}激动剂均能增加电压依赖型 Ca^{2+}通道的 Ca^{2+}内流，以延长动作电位的持续时间。Bay K8644 延长 L-型钙通道的开放时程，增加通道开放频率，使钙离子内流增加，引起神经元胞内钙离子浓度升高(Griffith et al, 1994)。而 DHPs 类 Ca^{2+}拮抗剂可以使 L-型钙通道的长时程开放相改变为成簇的短时程开放相，即从第二开放方式（长时程）改变为主要为第一开放方式（短时程）。Nimodipine 通过这一机制使钙离子进入钙通道的速率减弱，而通道的电导不受影响，从而使神经元的胞内钙离子浓度降低 (Langley & Sorkin, 1989)。

本研究采用激光共聚焦和荧光分光光度计两种方法得到的结果一致表明，Bay k8644 和 nimodipine 对纯化的星形胶质细胞胞内游离钙浓度的影响与对培养的神经元的作用相同。即 Bay k8644（0.001 和 0.01mmol/L）可导致培养的小鼠星形胶质细胞胞内钙显著增高；而 nimodipine（0.01 mmol/L）则使培养的小鼠星形胶质细胞胞内钙显著降低。MacVicar & Tse(1988)在培养的星形胶质细胞上以双微电极电压钳技术记录到了和神经元上 L-型电流非常相似的钙电流，提示 Bay k8644 和 nimodipine 通过作用于星形胶质细胞上的 L-型钙通道改变其胞内钙水平。

MacVicar et al (1991)使用经典钙成像技术证明，用 50 mmol/L 的 KCl 导致培养了 4—6 周的啮齿类胚胎星形胶质细胞胞内钙离子浓度产生一个幅度为 300—400nmol/L 的增加。其被 KCl 触发的

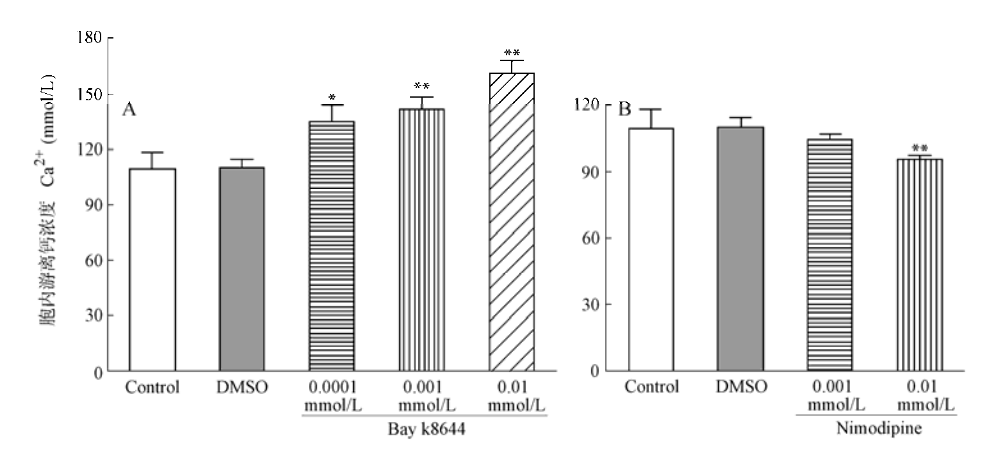


图 4　Bay k8644（A）和 nimodipine（B）对培养的小鼠星形胶质细胞胞内游离钙浓度的影响

Fig.4　The effects of Bay k8644（A） and nimodipine（B） on the intra-cellular calcium concentration of cultured mouse astrocytes

结果表示为平均数±标准误（The results were expressed as Mean ± *SE*），$n = 4$，$*P < 0.05$，$**P < 0.01$，$***P < 0.001$ vs. control.

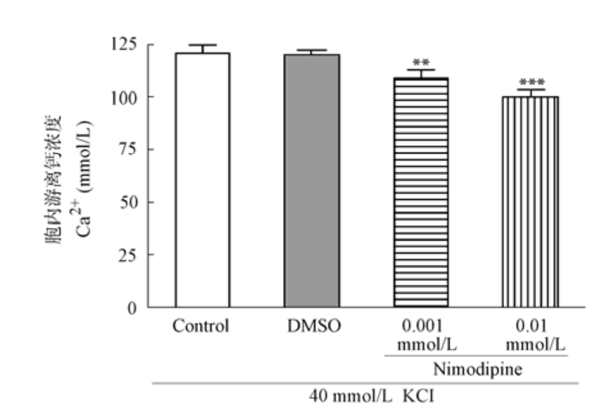


图 5 Nimodipine 拮抗 40 mmol/L KCl 对培养的小鼠星形胶质细胞胞内钙的升高作用

Fig.5 The antagonising effects on the increase of [Ca2+]i induced by KCl 40 mmol/L in cultured mouse astrocytes.

结果表示为平均数 ± 标准误（The results were expressed as Mean ± SE），n = 4， **P＜ 0.01，***P＜ 0.001 vs. control.

胞内钙离子浓度的升高，可以被 nifedipine 抑制，并能被 Bay k8644 显著增强。此外有报道指出，在培养的大鼠皮层星形胶质细胞上，25—100 mmol/L 的 KCl 会引起 $[Ca^{2+}]_i$ 大幅度增加，这种增加可以被 nimodipine 抑制(Fatatis & Russell, 1992)。本研究使用荧光分光光度计技术亦发现，nimodipine 在 0.001 mmol/L 和 0.01 mmol/L 浓度时可以显著降低 KCl 造成的小鼠星形胶质细胞胞内钙离子浓度的升高。KCl 引起的钙离子的内流亦是通过 L-型钙通道实现的，进一步证明在星形胶质细胞上存在 L-型钙通道。

迄今为止，尚未见有 Bay k8644 和 nimodipine 对神经元钙通道作用时间的动态观察报道。本研究观察到，Bay k8644 使星形胶质细胞的胞内游离钙浓度迅速升高，作用 20 s 时达到峰值，然后逐渐下降，80 s 时基本恢复到加入试剂前的基础值。而 nimodipine 在加入后 50 s 才达到峰值，但持续作用时间较长，在加入试剂后 80 s，胞内游离钙浓度仍显著低于对照组。Bay k8644 和 nimodipine 对星形胶质细胞钙通道作用时间上的差异，可能与其作用靶点不同有关，此外还可能与它们对作用位点的亲和力、结合速率和解离速率不同有关，有待进一步研究。

参考文献：

Burnier M, Centeno G, Burki E, Brunner HR. 1994. Confocal microscopy to analyze cytosolic and nuclear calcium in cultured vascular cells ［J］. *Am J Physiol*, **266**(4 Pt 1): C1118-C1127.

Duffy S, MacVicar BA. 1996. In vitro ischemia promotes calcium influx and intracellular calcium release in hippocampal astrocytes［J］. *J Neuroscil*, **16**: 71-81.

Fanelli RJ, McCarthy RT, Chisholm J. 1994. Neuropharmacology of nimodipine: From single channels to behavior［J］. *Ann NY Acad Sci*, **747**: 336.

Fatatis A, Russell JT. 1992. Spontaneous changes in intracellular calcium concentration in type Ⅰ astrocytes from rat cerebral cortex in primary culture［J］. *Glia*, **5**(2): 95-104.

Griffith WH, Taylor L, Davis MJ. 1994. Whole-cell and single-channel calcium currents in guinea pig basal forebrain neurons［J］. *J Neurophysiol*, **71**: 2359

Hirasawa T, Nakamura T, Morita M, Ezawa I, Miyakawa H, Kudo Y. 1998. Activation of dihydropyridine sensitive Ca^{2+} channels in rat hippocampal neurons in culture by parathyroid hormone［J］. *Neurosci Lett*, **256**(3): 139-142.

Jensen AM, Chiu SY. 1991. Differential intracellular responses to glutamate in type 1 and type 2 cultured brain astrocytes［J］. *J Neurosci*, **11**: 1674-1684.

Langley MS, Sorkin EM. 1989. Nimodipine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in cerebrovascular disease［J］. *Drugs*, **37**(5): 669-699.

Liu J, He ZY, Xiao YB, Yin JF, Wang PY. 2002. Nuclear calcium oscillation in cultured neonatal rat myocytes［J］. *Chinese Journal of Pathophysiology*,**18**(8): 892-895.[刘 健，何作云，肖颖彬，殷均斐，王培勇．2002．大鼠心肌细胞胞浆和核 Ca^{2+}震荡现象及其机制探讨．中国病理生理杂志, **18**(8): 892-895.]

MacVicar BA. 1984. Voltage-dependent calcium channels in glial cells［J］. *Science*, **226**: 1345-1347.

MacVicar BA, Tse FW. 1988. Norepinephrine and cyclic adenosine 3′:5′-cyclic monophosphate enhance a nifedipine-sensitive calcium current in cultured rat astrocytes［J］. *Glia*, **1**: 359-365.

MacVicar BA, Hochman D, Delay MJ, Weiss S. 1991. Modulation of intracellular Ca^{2+} in cultured astrocytes by influx through voltage-activated Ca^{2+} channels［J］. *Glia*, **4**: 448-455.

McCarthy KD, DeVellis J. 1980. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue［J］. *J Cell Biol*, **85**: 890-902.

Porter JA, McCarthy KD. 1995. GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligand with increased in $[Ca^{2+}]i$［J］.*Glia*, **13**: 101-112.

Vernadakis A, Mangoura D, Sakellaridis N, Linderholm S. 1984. Glial cells dissociated from newborn and aged mouse brain［J］. *J Neurosci Res*, **11**(3): 253-262.

Wu JF, Zhang JT. 1998. Effects of nerve growth factor on intracellular free Ca^{2+} in oxygen/glucose-deprived cultures from cerebral cortex of fetal rats［J］. *Acta Pharmaceutica Sinica*, **33**(5): 330-334. [吴俊芳，张均田．1998．缺氧缺糖条件下大鼠脑皮质神经元内游离钙浓度的变化及神经生长因子的作用．药学学报, **33**(5): 330-334.]

Yamamoto H, Hwang O, Van Breemen C.1984. Bay K8644 differentiates between potential and receptor operated Ca^{2+} channels［J］.*Eur J Pharmacol*, **102**(3-4): 555-557.